

# Transfer Gen Horizontal dan Populasi Bakteri Filosfer pada Kapas Transgenik dan Nontransgenik

## *Horizontal Gene Transfer and Population of Phyllosphere Bacteria on Transgenic and Nontransgenic Cotton*

ROHANI CINTA BADIA GINTING\*, ANTONIUS SUWANTO\*, ARIS TJAHJOLEKSONO

*Departemen Biologi, FMIPA, Institut Pertanian Bogor, Jalan Raya Pajajaran, Bogor 16144*

Diterima 5 September 2003/Disetujui 27 Juni 2005

The possibility of horizontal gene transfer of plant genomic DNA and bacteria in the soil, particularly as this relates to the possible transfer of genes encoding antibiotic resistance, has been seen as hazard associated with genetically engineered plants. It is hypothesized that introduction of bacterial genes into the plant genome leads to a higher probability of gene transfer from plants to bacteria due to the presence of homologous sequences. Bollgard (BG) cotton was constructed through the introduction of *cryIA(c)* gene, encodes for insecticidal activity againsts *Lepidopteran* pests, together with genes for spectinomycin/streptomycin resistant (*aad*) and kanamycin resistant (*nptII*), into the genome of a conventional cotton variety, Delta Pine (DP). The aim of this study were to evaluate the ability of naturally competent *Acinetobacter calcoaceticus* strain ADP1 to take up and integrate transgenic plant DNA based on homologous recombination under optimized laboratory condition, and to compare phyllosphere microbial population resistant to antibiotic on leaves of transgenic and nontransgenic plant. The results showed that transformation of ADP1 cells with Bollgard DNA was not detected on nitrocellulose membrane nor in sterile soil. Total phyllosphere bacterial population on leaves collected from one month after planting were  $1.3 \times 10^8$  and  $1.6 \times 10^8$  cfu/g leave fresh weight for BG and DP, respectively. Samples collected after three month contained  $5.9 \times 10^7$  and  $7.1 \times 10^7$  cfu/g leave fresh weight for BG and DP, respectively. This study also showed that there was no significant difference of phyllosphere bacterial population resistant to streptomycin and kanamycin on leaves of BG or DP samples collected from one or three month after planting.

### PENDAHULUAN

Kapas Bt varietas Bollgard (NuCOTN35B) merupakan salah satu produk tanaman transgenik yang dikonstruksi dengan cara menyisipkan gen *cryIA(c)* *Bacillus thuringiensis* ke dalam genom kapas isogeniknya, yaitu varietas Delta Pine (DP). Selain itu, ke dalam genom kapas Bollgard (BG) disisipkan dua gen penanda antibiotik untuk menyeleksi tanaman transforman, yaitu gen *aad* dan *nptII*. Gen *aad* menyandikan enzim aminoglikosida adeniltransferase yang dapat menginaktivasi antibiotik spektinomisin/streptomisin, tetapi gen ini tidak diekspresikan dalam kapas BG (Fling *et al.* 1985). Gen *nptII* menyandikan enzim neomisin phosphotransferase II yang dapat menginaktivasi antibiotik aminoglikosida seperti kanamisin dan gen ini diekspresikan dalam kapas BG (Fuchs *et al.* 1993). Penggunaan kapas Bt diharapkan dapat mengurangi penggunaan pestisida kimia dan pencemaran lingkungan, mengurangi biaya produksi, dan pada akhirnya meningkatkan pendapatan petani (Shelton *et al.* 2000).

Disamping keuntungan dari penggunaan tanaman transgenik, ada kekhawatiran akan kemungkinan risiko pelepasan tanaman tersebut terhadap lingkungan, antara lain

transfer gen secara horizontal dari tanaman transgenik ke bakteri yang terjadi di dalam tanah. Smith *et al.* (1992) melaporkan bahwa transfer gen secara horizontal dapat terjadi secara alami antara bakteri dengan tanaman. Selain itu, konstruksi DNA tanaman transgenik sampai saat ini umumnya membawa bahan genetika yang berasal dari bakteri, virus, atau bahan genetika lainnya. Diasumsikan bahwa dengan memasukkan gen bakteri ke dalam genom tanaman akan meningkatkan kemungkinan transfer gen dari tanaman ke bakteri karena adanya sekuen DNA yang homolog dari gen bakteri di dalam genom tanaman. Selain gen yang menyandikan fenotipe utama, ke dalam tanaman transgenik juga diintroduksi gen penanda (*marker gene*). Dari lima belas macam gen penyandi resistensi antibiotik yang disisipkan ke dalam tanaman (Metz & Nap 1997), beberapa di antaranya merupakan gen yang menyandikan resistensi antibiotik yang biasa digunakan secara klinis. Dengan demikian, transfer gen horizontal dari DNA tanaman transgenik ke mikrob dikhawatirkan akan menghasilkan bakteri patogen yang resisten terhadap antibiotik.

Filosfer merupakan habitat bagi berbagai populasi cendawan dan bakteri (Beattie & Lindow 1994; Wilson & Lindow 1994). Semua spesies tanaman dalam habitat alami berasosiasi dengan mikrob filosfer yang memanfaatkan eksudat yang dikeluarkan oleh daun sebagai sumber energi dan sumber nutrisinya.

\*Alamat kini: Balai Penelitian Tanah, Jalan Tentara Pelajar No. 3A, Bogor 16111

\*Penulis untuk korespondensi, Tel./Fax. +62-251-315107, E-mail: asuwanto@indo.net.id

Dalam penelitian ini dilakukan transformasi DNA pada kondisi laboratorium untuk menguji kemampuan *Acinetobacter calcoaceticus* ADP1 menangkap dan mengintegrasikan DNA dari kapas transgenik. Semua perlakuan transformasi menggunakan galur ADP1 sebagai resipien. Bakteri ini dikenal sebagai bakteri yang kompeten secara alami sehingga dapat mengambil DNA bebas dalam proses transformasi (Juni 1972). Sebagai kontrol positif dilakukan transformasi DNA berdasarkan pada rekombinasi homolog. Di samping itu, dilakukan analisis untuk membandingkan populasi bakteri filosfer resisten terhadap antibiotik pada daun kapas BG dan DP. Sebagai media seleksi digunakan media King's B 10% dengan tambahan antibiotik streptomisin atau kanamisin.

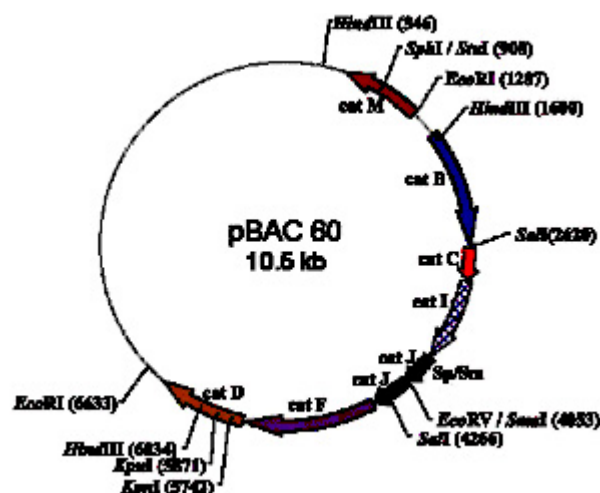
Penelitian ini bertujuan mempelajari kemungkinan terjadinya transfer gen horizontal gen penyandi resistensi antibiotik dari kapas transgenik ke bakteri tanah. Selain itu, membandingkan populasi bakteri filosfer resisten terhadap antibiotik pada daun kapas transgenik dan nontransgenik.

## BAHAN DAN METODE

**Bahan.** Daun kapas transgenik varietas Bollgard, NuCOTN35B, dan daun kapas nontransgenik isogeniknya, yaitu varietas Delta Pine, diperoleh dari PT. Monagro Kimia, Jakarta. Bakteri *A. calcoaceticus* ADP1 dan pBAC60 diperoleh dari Dr. Ellen Neidle, Department of Microbiology, University of Georgia, Athens, USA. Media yang digunakan ialah media King's B 10% (Sambrook & Russell 2001), media minimal dengan tambahan asam suksinat 10 mM (Suryanto 2001), dan media metilotrof (Ismail 2002). Transformasi dilakukan pada dua macam media, yaitu membran nitroselulosa steril dengan diameter pori ukuran 0.45 µm (Millipore, Bedford, Mass, USA) dan dalam tanah steril (tanah Latosol kering udara dengan kadar air 25%).

**Uji Transfer Gen Horizontal dari Tanaman Transgenik ke Bakteri.** DNA kapas BG diekstraksi dari daun berumur dua minggu menggunakan metode Permingleat *et al.* (1998), sedangkan DNA pBAC60 diisolasi menggunakan kit Qiaprep Miniprep (Qiagen, Germany). Selanjutnya konsentrasi DNA diukur menggunakan GeneQuant (Pharmacia Biotech, England) pada panjang gelombang 260 nm. Plasmid pBAC60 dipotong dengan enzim restriksi *EcoRI* sehingga menghasilkan dua potongan DNA yang berukuran sekitar 5.3 dan 5.1 kb. Pemilihan enzim restriksi berdasarkan pada peta plasmid pBAC60 (Gambar 1) untuk mendapatkan sekuen DNA homolog dengan bakteri ADP1. Komposisi campuran reaksi pemotongan DNA terdiri atas 10 µl DNA pBAC60, 2 µl bufer *EcoRI* 10 x, 1 µl enzim restriksi *EcoRI* (10 unit/µl), dan 7 µl ddH<sub>2</sub>O (Sambrook & Russell 2001). Hasil pemotongan DNA diverifikasi dengan elektroforesis gel agarosa 0.8% dan diamati menggunakan sinar UV (Sambrook & Russell 2001).

Bakteri *A. calcoaceticus* ADP1 dikulturkan dalam media minimal cair, lalu disubkulturkan pada media yang sama dengan pengenceran 1:25 sampai mencapai *optical density* (OD) 0.2 pada panjang gelombang 600 nm (awal fase log). Ke dalam tiga tabung mikro 1.5 ml masing-masing dimasukkan 1 ml subkultur, disentrifugasi dengan kecepatan 4000 x g



Gambar 1. Peta plasmid pBAC60.

selama 1 menit. Pelet diresuspensikan dalam 30, 29, dan 27.5 µl bufer fosfat (Sambrook & Russell 2001) dan digunakan sebagai sel resipien.

DNA kapas (720 ng dalam volume 1 µl) dicampur dengan 29 µl suspensi sel *A. calcoaceticus* ADP1. Sebagai kontrol positif dilakukan pencampuran antara 720 ng DNA pBAC60 (volume 2.5 µl) dengan 27.5 µl suspensi sel ADP1. Sebagai kontrol negatif ialah suspensi sel ADP1 dalam 30 µl bufer fosfat. Pencampuran dilakukan dalam tabung mikro 1.5 ml. Ada dua macam media transformasi yang digunakan, yaitu membran nitroselulosa dan tanah yang telah disterilkan dengan autoklaf pada suhu 120 °C selama 30 menit. Membran nitroselulosa diletakkan di atas media agar-agar minimal. Demikian juga 200 mg tanah steril diletakkan di atas membran nitroselulosa yang diletakkan di atas media tersebut. Suspensi sel ADP1 dituangkan di atas media transformasi dan diinkubasi selama 15-20 jam pada suhu ruang. Selanjutnya media transformasi diambil secara aseptik, dimasukkan ke dalam tabung mikro baru yang berisi 1 ml bufer fosfat dan dicampur selama 2 menit untuk resuspensi sel.

Jumlah transforman diseleksi dengan menyebar sebanyak 25, 50, dan 100 µl suspensi sel hasil transformasi pada media agar-agar minimal dengan tambahan antibiotik spektinomisin/streptomisin masing-masing dengan dosis 50 µg/ml. Jumlah total resipien diperoleh dengan menyebar 100 µl suspensi sel hasil transformasi pada media agar-agar minimal. Frekuensi transforman diperoleh dari rata-rata tiga kali ulangan dan setiap ulangan dilakukan penyebaran triplo. Frekuensi transforman dihitung sebagai berikut:

$$\text{Frekuensi transforman} = \frac{\text{jumlah transforman/ml}}{\text{jumlah resipien/ml}} \times 100\%$$

**Analisis Bakteri Filosfer pada Kapas Transgenik dan Nontransgenik.** Bakteri filosfer dari daun kapas BG dan DP diisolasi dengan menggunakan metode rendaman daun (Ismail 2002). Daun kapas diambil dari lahan Analisis Risiko Lingkungan PT. Monagro Kimia di Sulawesi Selatan, yaitu dari kapas yang berumur 1 dan 3 bulan. Penelitian disusun dalam rancangan acak lengkap dengan dua faktor yang diulang empat kali. Faktor pertama ialah dua jenis tanaman, yaitu BG

dan DP, faktor kedua ialah enam macam media pertumbuhan, yaitu media King's B 10% + streptomisin (Sm) dosis rendah (10 µg/ml); media King's B 10% + Sm dosis normal (50 µg/ml); media King's B 10% + kanamisin (Kan) dosis rendah (20 µg/ml); media King's B 10% + Kan dosis normal (100 µg/ml); dan sebagai kontrol ialah media King's B 10%; dan media metilotrof untuk bakteri *pink pigmented facultative methylotroph* (PPFM). Ke dalam masing-masing media ditambahkan 0.5 mg/ml Benlate (Dupont, Perancis) untuk mencegah pertumbuhan khamir dan cendawan. Bakteri filosoffer yang ditumbuhkan dalam media King's B diinkubasi selama 1-2 hari, sedangkan bakteri yang ditumbuhkan dalam media metilotrof diinkubasi selama 5-7 hari pada suhu kamar. Populasi bakteri filosoffer per bobot daun dihitung dan dianalisis dari hasil penyebaran triplo dan diulang sebanyak empat kali. Total populasi bakteri filosoffer dihitung dari jumlah bakteri filosoffer yang disebar dalam media King's B 10% tanpa tambahan antibiotik.

## HASIL

**Uji Transfer Gen Horizontal.** Transfer gen horizontal dari DNA tanaman kapas BG ke dalam bakteri ADP1, baik yang dilakukan di atas membran nitroselulosa maupun dalam tanah steril, tidak menghasilkan transforman ( $<10^{-10}$  per resipien). Frekuensi transforman antara bakteri ADP1 dengan DNA pBAC60 linear (kontrol positif) yang dilakukan di atas membran nitroselulosa ialah  $2.6 \times 10^{-6}$  per resipien, sedangkan frekuensi transforman dalam tanah steril ialah  $2.3 \times 10^{-7}$  per resipien. Transformasi antara bakteri ADP1 dengan bufer fosfat (kontrol negatif) yang dilakukan di atas membran nitroselulosa maupun dalam tanah steril tidak menghasilkan transforman ( $<10^{-10}$  per resipien) (Tabel 1).

**Analisis Kelimpahan Sejumlah Bakteri Filosoffer pada Kapas BG dan DP.** Total populasi bakteri filosoffer daun kapas BG dan DP pada media King's B 10% tanpa tambahan antibiotik jumlahnya paling banyak baik pada kapas umur satu bulan maupun tiga bulan. Total populasi bakteri filosoffer pada daun kapas BG dan DP umur satu bulan berturut-turut ialah  $1.3 \times 10^8$  dan  $1.6 \times 10^8$  cfu/g daun segar, sedangkan pada kapas umur tiga bulan ialah  $5.9 \times 10^7$  dan  $7.1 \times 10^7$  cfu/g daun segar. Populasi bakteri filosoffer pada daun kapas umur tiga bulan cenderung lebih kecil dibanding dengan kapas umur satu bulan (Tabel 2).

Populasi bakteri filosoffer resisten terhadap antibiotik streptomisin atau kanamisin pada daun kapas BG tidak berbeda nyata dengan daun kapas DP, baik pada kapas umur satu bulan maupun tiga bulan (Tabel 2). Populasi bakteri filosoffer resisten terhadap antibiotik streptomisin dan kanamisin tidak

berbeda nyata antara daun kapas BG dengan DP yang berumur sama (Tabel 2).

## PEMBAHASAN

**Uji Transfer Gen Horizontal.** Bakteri ADP1 tidak mempunyai resistensi terhadap antibiotik spektinomisin/streptomisin sedangkan DNA pBAC60 dan kapas BG mempunyai gen penyandi resistensi terhadap antibiotik tersebut. Dengan demikian transforman yang diharapkan merupakan bakteri ADP1 resisten terhadap spektinomisin/streptomisin yang tumbuh pada media minimal dengan antibiotik spektinomisin/streptomisin. Bufer fosfat tidak mengandung DNA dan bakteri ADP1 tidak dapat tumbuh dalam media seleksi karena rentan terhadap spektinomisin/streptomisin. Tidak terdeteksinya transforman pada perlakuan transformasi antara bakteri ADP1 dengan bufer fosfat menunjukkan bahwa tidak ada mutan yang terjadi secara spontan.

Pada perlakuan transformasi antara bakteri ADP1 dengan DNA pBAC60 linear terlihat adanya transforman. Frekuensi transforman di atas membran nitroselulosa ialah  $2.6 \times 10^{-6}$  per resipien dan dalam tanah steril ialah  $2.3 \times 10^{-7}$  per resipien. Transformasi tersebut dapat terjadi karena adanya sekuen DNA homolog yang tinggi antara utas DNA donor, yaitu pBAC60, dan DNA resipien, yaitu bakteri ADP1, sehingga memungkinkan terjadinya rekombinasi homolog. Sejumlah sekuen gen pBAC60 yang homolog dengan sekuen gen bakteri ADP1 ialah gen *cat*. Gen *cat* dapat mendegradasi katekol (Neidle *et al.* 1989). Frekuensi transforman yang terjadi pada tanah steril lebih rendah daripada yang terjadi di atas membran nitroselulosa. Hal ini terjadi karena tanah juga dapat menghambat efisiensi transformasi (Schluter *et al.* 1995; Nielsen *et al.* 1997).

Tidak terdeteksinya transforman dalam perlakuan transformasi antara bakteri ADP1 dengan DNA kapas BG diduga karena tidak adanya sekuen homolog antara DNA kapas BG dengan bakteri ADP1. Nielsen *et al.* (1997) melaporkan bahwa transfer gen dapat terjadi pada kondisi laboratorium jika ada sekuen DNA homolog antara resipien dan donor yang memungkinkan rekombinasi homolog. Demikian juga asumsi transfer gen dari kromosom tanaman ke bakteri dapat terjadi di dalam tanah jika sekuen homolog tersedia dalam tanaman dan bakteri kompeten.

Tabel 2. Perbandingan populasi bakteri filosoffer resisten terhadap antibiotik pada daun kapas Bollgard dan Delta Pine. Angka-angka dalam satu baris dan pada kapas dengan umur yang sama, yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf 5% uji Duncan. Sm: Streptomisin, Kan: kanamisin, PPFM: *pink pigmented facultative methylotroph*

Media perlakuan	Bollgard	Delta pine	Bollgard	Delta pine
	..... (1 bulan) .....	..... (1 bulan) .....	..... (3 bulan) .....	..... (3 bulan) .....
	..... log cfu/g daun segar .....			
King's B 10% + Sm 10 µg/ml	5.2 x 10 <sup>7</sup> a	2.3 x 10 <sup>7</sup> a	4.1 x 10 <sup>6</sup> a	6.2 x 10 <sup>6</sup> a
King's B 10% + Sm 50 µg/ml	1.3 x 10 <sup>7</sup> a	4.6 x 10 <sup>6</sup> a	6.3 x 10 <sup>5</sup> a	6.8 x 10 <sup>5</sup> a
King's B 10% + Kan 20 µg/ml	5.6 x 10 <sup>6</sup> a	8.2 x 10 <sup>6</sup> a	1.7 x 10 <sup>6</sup> a	1.5 x 10 <sup>6</sup> a
King's B 10% + Kan 100 µg/ml	6.0 x 10 <sup>5</sup> a	6.2 x 10 <sup>5</sup> a	5.1 x 10 <sup>4</sup> a	5.3 x 10 <sup>4</sup> a
King's B 10%	1.3 x 10 <sup>8</sup> a	1.6 x 10 <sup>8</sup> a	5.9 x 10 <sup>7</sup> a	7.1 x 10 <sup>7</sup> a
PPFM	3.4 x 10 <sup>4</sup> a	1.9 x 10 <sup>4</sup> a	7.4 x 10 <sup>4</sup> a	8.1 x 10 <sup>4</sup> a

Tabel 1. Frekuensi transforman antara bakteri ADP1 dengan DNA kapas Bollgard, DNA pBAC60, dan bufer fosfat yang dilakukan pada membran nitroselulosa dan tanah steril

Transformasi antara bakteri ADP1 dengan:	Frekuensi transformasi (%)	
	Membran nitroselulosa	Tanah steril
DNA kapas Bollgard	$<10^{-10}$	$<10^{-10}$
DNA pBAC60 (kontrol positif)	$2.6 \times 10^{-6}$	$2.3 \times 10^{-7}$
Bufer fosfat (kontrol negatif)	$<10^{-10}$	$<10^{-10}$

Persyaratan yang harus ada untuk dapat melangsungkan proses transformasi secara alami di dalam tanah ialah tersedianya DNA bebas, tersedianya sel kompeten, dan stabilitas integrasi dari DNA yang masuk ke dalam genom bakteri (Nielsen *et al.* 1997). Umumnya bakteri dalam lingkungan alami tidak kompeten menerima DNA bebas. Saat ini ada sekitar empat puluh spesies bakteri yang sebagian besar merupakan bakteri yang hidup dalam tanah atau dalam air diketahui mempunyai kemampuan transformasi secara alami yang sering disebut dengan kompeten secara alami (Lorenz & Wackernagel 1994), tetapi bakteri tidak mengekspresikan sifat kompetensi tersebut secara konstitutif. Sifat kompetensi hanya diekspresikan ketika awal memasuki fase stasioner, saat itu kerapatan bakteri tinggi (Nielsen *et al.* 1997; Snyder & Champness 1997). Bakteri ADP1 merupakan bakteri kompeten secara alami sehingga dapat mengambil DNA bebas dalam proses transformasi (Juni & Janik 1969). Namun demikian, bakteri tersebut dengan cepat kehilangan kemampuan untuk menerima, menstabilisasi, dan atau mengekspresikan DNA eksogen setelah dimasukkan ke dalam tanah (Nielsen *et al.* 1997).

Gen yang ada pada tanaman dan berada di bawah promotor tanaman pada umumnya tidak akan bekerja pada bakteri. Pada proses transformasi secara alami, kemampuan bakteri secara aktif mengambil atau menangkap DNA bebas merupakan suatu mekanisme sehingga DNA tanaman dapat ditransfer ke bakteri. Beberapa kelompok peneliti telah melakukan transformasi DNA tanaman transgenik yang berbeda dengan berbagai bakteri yang kompeten secara alami (Schluter *et al.* 1995; Nielsen *et al.* 1997) pada kondisi laboratorium ataupun di lapangan, tetapi belum berhasil memperoleh transforman. DNA plasmid diketahui dapat mentransformasi bakteri pada kondisi laboratorium. Perbedaannya dengan DNA tanaman mungkin karena DNA plasmid berbentuk sirkuler, sedangkan DNA tanaman berbentuk linear. DNA linear mempunyai efisiensi transformasi yang sangat kecil bila dibandingkan dengan DNA sirkuler. Secara umum spesies bakteri mempunyai kemampuan yang berbeda dalam menerima DNA dari lingkungannya dan frekuensi transformasi sangat kecil bahkan pada kondisi yang ideal (McLean & MacKenzie 2000).

Gebhard dan Smalla (1998) berhasil melakukan transformasi DNA tanaman gula bit ke bakteri *Acinetobacter* sp. dan memperoleh frekuensi rekombinan sebesar  $1.5 \times 10^{-10}$  per resipien. Frekuensi transformasi ini relatif sangat kecil atau dapat dikatakan tidak terjadi walaupun telah dilakukan dalam kondisi yang optimum. Kalaupun hal tersebut tidak diabaikan, kejadian itu tidak ada artinya bila tidak diikuti dengan paparan antibiotik secara terus-menerus di lingkungan tersebut.

Gen resistensi antibiotik asal bakteri merupakan gen yang banyak digunakan sebagai penanda di dalam tanaman transgenik. Penggunaan gen penanda resistensi antibiotik ini dikhawatirkan akan menimbulkan bakteri patogen yang resisten terhadap antibiotik. Hipotesis bahwa penyebaran gen resistensi antibiotik disebabkan oleh tanaman transgenik tidak terlihat dalam penelitian ini. Peningkatan resistensi antibiotik

pada bakteri merupakan hasil dari evolusi bakteri untuk mempertahankan diri (Lewis 1995). Pada percobaan transformasi yang dilakukan di laboratorium dengan kondisi optimum ternyata tidak terdeteksi adanya transforman.

**Analisis Kelimpahan Sejumlah Bakteri Filosfer pada Kapas BG dan DP.** Media King's B merupakan media kaya yang mendukung pertumbuhan bakteri filofosfer. Beattie dan Lindow (1994) menyatakan semua spesies tanaman yang tumbuh dalam habitat alami telah berasosiasi dengan mikroflora epifit.

Populasi bakteri filofosfer pada daun kapas umur tiga bulan cenderung lebih kecil dibandingkan dengan pada daun umur satu bulan (Tabel 2). Tanaman kapas umur tiga bulan sudah mulai berbunga dan daun terlihat mulai tua yang ditandai dengan perubahan warna daun menjadi kekuning-kuningan. Menurunnya populasi bakteri filofosfer tersebut kemungkinan karena ketersediaan nutrisi pada daun semakin berkurang karena nutrisi untuk pertumbuhan dan perkembangan bunga. Nutrisi yang mendukung pertumbuhan bakteri ialah antara lain karbohidrat, asam organik, dan asam amino. Demikian juga, jenis inang tanaman, umur daun, letak daun, kondisi fisik lingkungan, serta inokulum imigran juga terlibat di dalam penentuan spesies mikrob filofosfer (O'Brien & Lindow 1989; Wilson & Lindow 1994; Kinkel *et al.* 1996).

Suplemen antibiotik dalam media sangat nyata mempengaruhi hasil penghitungan total populasi bakteri filofosfer dari contoh daun kapas, semakin tinggi dosis yang digunakan maka daya hambatnya semakin kuat. Suplemen antibiotik kanamisin dalam media nyata lebih menghambat pertumbuhan bakteri filofosfer daripada suplemen antibiotik streptomisin (data tidak disajikan). Kekuatan antibiotik membunuh bakteri dipengaruhi oleh tiga faktor, yaitu dosis, lamanya kontak, dan kepadatan sel bakteri. Senyawa antibiotik akan terserap lebih banyak bila dosisnya ditingkatkan. Streptomisin dan kanamisin mempunyai spektrum aktivitas yang luas, menghambat translasi pada sel tanaman, hewan, dan bakteri (Snyder & Champness 1997).

Populasi bakteri filofosfer resisten terhadap streptomisin atau kanamisin pada daun kapas BG dan DP umur tiga bulan lebih sedikit bila dibandingkan dengan tanaman umur satu bulan, kecuali bakteri PPFM. Tanaman kapas merupakan tanaman semusim sehingga kemungkinan nutrisi banyak digunakan untuk pertumbuhan dan perkembangan bunga. Dengan demikian, nutrisi dalam daun semakin sedikit. Menurunnya komposisi dan kuantitas nutrisi pada daun mempengaruhi pertumbuhan bakteri filofosfer resisten terhadap streptomisin atau kanamisin.

Populasi bakteri filofosfer resisten terhadap antibiotik streptomisin atau kanamisin pada daun kapas BG umur satu dan tiga bulan tidak berbeda nyata dibandingkan dengan daun kapas DP. Hasil ini didukung oleh data hasil uji kemungkinan transformasi dari tanaman BG ke dalam bakteri ADP1. Pada percobaan yang dilakukan di laboratorium dengan kondisi optimum ternyata tidak terdeteksi adanya transforman. Bahkan pada percobaan transformasi yang dilakukan berdasarkan rekombinasi homolog antara DNA pBAC60



dengan resipien bakteri ADP1 yang kompeten secara alami diperoleh frekuensi transformasi yang sangat kecil yaitu  $2.6 \times 10^{-6}$  per resipien yang dilakukan di atas membran nitroselulosa dan  $2.3 \times 10^{-7}$  per resipien dalam tanah steril. Dengan demikian, kemungkinan DNA tanaman tertransformasi ke bakteri filosoffer yang ada dalam daun kapas BG sangat kecil.

Fenotipe kapas BG sama dengan fenotipe kapas DP. Gen *aad* dan *nptII* merupakan gen yang menyandikan protein yang akan mengekspresikan resistensi terhadap antibiotik. Dari hasil penelitian ini ternyata metabolisme protein yang dihasilkan oleh gen-gen tersebut tidak mempengaruhi keberadaan bakteri filosoffer pada daun kapas BG. Keberadaan gen penyandi resistensi streptomisin dan kanamisin dalam tanaman kapas transgenik (BG) tidak mempengaruhi populasi bakteri PPFM dan bakteri filosoffer resistensi streptomisin atau kanamisin pada daun kapas tersebut. Dengan demikian, pada penelitian ini hasil metabolisme kapas BG sama dengan hasil metabolisme kapas isogeniknya, yaitu kapas DP dan tidak mempengaruhi keberadaan bakteri filosoffer dalam daunnya.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Beattie GA, Lindow SE. 1994. Epiphytic fitness of phytopathogenic bacteria: physiological adaptations for growth and survival. *Curr Top Microbiol Immunol* 192:1-27.
- Fling ME, Kopf J, Richards C. 1985. Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3(9)-O-nucleotidyltransferase. *Nucl Acids Res* 13:7095-7106.
- Fuchs RL *et al.* 1993. Safety assessment of the neomycin phosphotransferase II (NPTII) protein. *Bio/Technology* 11:1543-1547.
- Gebhard F, Smalla K. 1998. Transformation of *Acinetobacter* sp. strain BD413 by transgenic sugar beet DNA. *Appl Environ Microbiol* 64:1550-1554.
- Ismail YS. 2002. Kelimpahan dan keragaman genetik bakteri PPFM dari sejumlah daun tanaman tropis [Tesis]. Bogor: FMIPA, Institut Pertanian Bogor.
- Juni E. 1972. Interspecies transformation of *Acinetobacter*: genetic evidence for a ubiquitous genus. *J Bacteriol* 112:917-931.
- Juni E, Janik A. 1969. Transformation of *Acinetobacter calcoaceticus* (*Bacterium anitratum*). *J Bacteriol* 90:281-288.
- Kinkel LL, Wilson M, Lindow SE. 1996. Utility of microcosm studies for predicting phylloplane bacterium population sizes in the field. *Appl Environ Microbiol* 62:3413-3423.
- Lewis R. 1995. The rise of antibiotic-resistant infection. FDA Consumer Magazine. Vol. 29, No. 27. <http://www.fda.gov/fdac/features/795-antibio.html>. [13 Jan 2003].
- Lorenz MG, Wackernagel W. 1994. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol Rev* 58:563-602.
- McLean MA, MacKenzie DJ. 2000. *Principles and Practice of Environmental Safety Assessment of Transgenic Plants*. Ontario: Agriculture and Biotechnology Strategies Inc.
- Metz PLJ, Nap JP. 1997. A transgene-centered approach to the biosafety of transgenic plants: overview of selection and reporter genes. *Acta Bot Neerl* 46:25-50.
- Neidle EL, Hartnett C, Ornston LN. 1989. Characterization of *Acinetobacter calcoaceticus* cat M: a repressor gene homologous in sequence to transcriptional activator genes. *J Bacteriol* 171:5410-5421.
- Nielsen KM *et al.* 1997. Natural transformation and availability of transforming DNA to *Acinetobacter calcoaceticus* in soil microcosms. *Appl Environ Microbiol* 63:1945-1952.
- O'Brien RD, Lindow SE. 1989. Effect of plant species and environmental conditions on epiphytic population sizes of *Pseudomonas syringae* and other bacteria. *Phytopathology* 79:619-627.
- Permingeat HR, Romagnoli MV, Vallejos RH. 1998. A simple method for isolating high yield and quality DNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) leaves. *Plant Mol Biol Rep* 16:1-6.
- Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Ed ke-3. New York: Cold Spring Harbor Lab.
- Schluter K, Futterer J, Potrykus I. 1995. Horizontal gene transfer from a transgenic potato line to a bacterial pathogen (*Erwinia chrysanthemi*) occurs-if at all-at an extremely low frequency. *Biotechnology* 13:1094-1098.
- Shelton AM, Zhan JZ, Roosh RT. 2000. Economic, ecological, food safety, and social consequences of development of Bt transgenic plants. *Rev Entomol* 47:845-881.
- Smith MW, Feng DF, Doolittle RF. 1992. Evolution by acquisition: the case for horizontal gene transfer. *Trends Biochem Sci* 17:489-493.
- Snyder L, Champness W. 1997. *Molecular Genetics of Bacteria*. Washington: ASM Pr.
- Suryanto D. 2001. Selection and characterization of bacterial isolates for monocyclic aromatic degradation [Disertasi]. Bogor: FMIPA, Institut Pertanian Bogor.
- Wilson M, Lindow SE. 1994. Coexistence among epiphytic bacterial populations mediated through nutritional resource partitioning. *Appl Environ Microbiol* 60:4468-4477.